

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390364

研究課題名（和文） 可溶性組織因子および単球の薬理制御によるサル体外循環中の外因系凝固遮断法の確立

研究課題名（英文） Pharmacological control of soluble tissue factor and monocyte for the inhibition of the extrinsic coagulation pathway during cardiopulmonary bypass in monkeys

研究代表者

平松 祐司（HIRAMATSU YUJI）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：30302417

研究成果の概要（和文）：サル体外循環モデルにおいて、高濃度内因性 TFPI の血中誘導と PDE IV 阻害剤添加により可溶性組織因子と単球の活性化を阻害し、体外循環の主要凝固系路として近年注目されている外因系凝固を遮断することにより凝固・炎症反応を制御する新たな抗凝固手段の確立を目的とした。霊長類センターにて、体重 5kg のカニクイザルを用いて体外循環実験を行った。仮説に即した外因系凝固阻害効果が TFPI 早期誘導によって得られ、高濃度 TFPI 血中誘導は新たな体外循環中の抗凝固戦略となり得る。PDE IV 阻害薬 roripram による単球活性化阻害も有効であった。

研究成果の概要（英文）：Administration of high-dose heparin causes massive release of TFPI from vascular endothelial cells. We purposed to provide evidence to clarify the role of TFPI (with or without PDE IV inhibitor) in attenuation of TF-dependent thrombin generation during primate CPB. In the primate CPB model, plasma TFPI was enhanced by pre-heparinization, and levels of thrombin generation were reduced by inhibition of extrinsic pathway when compared with control group. PDE IV inhibitor reduced monocyte function and thrombin generation. Massive release of plasma TFPI induced by early heparin administration may attenuate TF-dependent thrombin generation during clinical CPB.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総 計	6,100,000	1,830,000	7,930,000

研究分野：心臓血管外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：心臓大血管外科学、体外循環、外因系凝固、TFPI、PDE IV 阻害薬、ヘパリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 代表者らは長く体外循環における凝固・線溶・炎症機転を薬理的に制御する“blood anesthesia strategy”の研究に携わってきた。最新の理論によれば、体外循環における凝固線溶機転亢進の主なトリガーは、接触系路ー内因系凝固系路よりもむしろ組織因子を発端とする外因系凝固系路にあるとされ、特に心嚢内貯留血中に増加する可溶性組織因子とこれを制御する内因性 TFPI (tissue factor pathway inhibitor) との生体内での応答様式、および活性化単球による第 VII および X 因子の賦活化が重要視されている。

(2) 内因性 TFPI は、可溶性組織因子/VIIa 複合体が Xa 因子を活性化する段階を阻害して強力な抗凝固作用を発揮すると言われる。活性化単球は組織因子、特に可溶性組織因子との相互作用により VII 因子を、また独自の作用により X 因子を強力に賦活化するが、PDE IV 阻害剤 roripram は単球細胞内への Ca 流入を阻止することにより、単球の活性化を強力に阻害する。本研究ではこれらの理論を応用し、可溶性組織因子と単球に効果的な薬理的制御を加えることにより、外因系凝固の亢進機転を可及的に抑制し、体外循環における新たな抗凝固理論の確立、blood anesthesia 完遂のための躍進的な抗凝固手段を得ることを企図した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、人工心肺装置による体外循環において、ヘパリン早期投与により高濃度内因性 TFPI を血中に誘導し、加えて PDE IV 阻害剤によって単球の活性化を抑制することにより、可溶性組織因子と活性化単核球による外因系系路の賦活化を阻止し、体外循環においてかつてない強力な凝固線溶・炎症機転の制御を達成し得るとの仮説を検証することを目的とした。

(2) カニクイザル体外循環において、高濃度内因性 total TFPI と PDE IV 阻害剤との協調作用により可溶性組織因子と単球の制御がなされ、外因系凝固系路の遮断を通じて凝固・線溶・血小板機能および炎症性メディエータ

ーを効果的に制御し得るか否かを検証した。

3. 研究の方法

(1) 体重 5kg 前後のカニクイザル

(Cynomolgus monkeys, *Macaca fascicularis*) に人工心肺装置を装着し、60 分間の心停止を含む 120 分間の体外循環をおこなうサル体外循環モデルを使用した。次の 3 群について血液凝固・線溶・炎症のパラメーターに関する比較検討をおこなった。

①[コントロール群]; 通常の体外循環に準じてヘパリン 3mg/kg を静脈内投与。心停止後、右心房から採取した血液を心嚢内に 30 分間留置し、心嚢での可溶性組織因子発現を惹起。

②[内因性 TFPI 誘導群]; コントロールと同様の操作に加え、手術開始 10 分前にヘパリン 3mg/kg を静脈内投与することによりあらかじめ内因性 total TFPI を誘導、可溶性組織因子阻害効果を高めた。

③[内因性 TFPI 誘導+PDE IV 阻害薬群]; コントロールと同様の操作+内因性 total TFPI 誘導による可溶性組織因子阻害+PDE IV 阻害薬 roripram による単球活性化阻害をおこない、外因系凝固系路の主要活性化過程の完全遮断を試みた。

(2) 3 群で経時的に測定した指標は以下の通り。トロンビン産生に関する血中 TAT と F1+2、線溶に関する D-dimer、炎症のマーカーとして好中球接着分子 CD11b と L-selectin、単球 CD11b と L-selectin。各群の血中 TFPI の経時的变化も観察した。

4. 研究成果

(1) 体外循環中の ACT は全群において常に 500 秒以上に維持された。あらかじめヘパリンを静脈内注射することにより TFPI を誘導した群では、TFPI 非誘導群と比較して約 8 倍の TFPI 血中濃度上昇を認めた($P<0.0001$)。すべての群において TAT、F1+2 および D-dimer は体外循環開始後有意に増加し、体外循環によるトロンビン産生の亢進が示された。

(2) TFPI 誘導群ではトロンビン産生の有意な低下がみられ、TF による外因系凝固活性化は体外循環における主要なトロンビン産生要

因であることが示された。

(3) TFPI 誘導に PDE IV 阻害を加えた群でもトロンビン産生の低下は TFPI 誘導群と同等に見られたが、炎症マーカーの減少を示すには至らなかった。

(4) サル体外循環モデルにおいて、体外循環開始によりおそらく接触-内因系系路を介してトロンビン産生は亢進したが、組織因子の活性化はトロンビン産生をさらに助長した。外因系凝固系路の本格的な活性化が開始される前の早期にヘパリンを静脈内注射することにより、血管内皮から約 8 倍の血中濃度となる TFPI を誘導でき、この高濃度内因性 TFPI は組織因子を発端とする外因系凝固系路の活性化に伴うトロンビン産生を効果的に抑制し得た。

(5) TFPI は血管内皮細胞で合成されるプロテアーゼインヒビターで、分子内には 3 つの Kunitz 型阻害領域を有し、第 1 Kunitz ドメインは TF-VIIa 因子複合体を、第 2 Kunitz ドメインは Xa 因子を阻害し、第 3 Kunitz ドメインの機能は明らかではないがヘパリンの作用を増強する可能性が示されている。こうした TFPI の特性から推察して、組織因子の関与を差し引いたとしても、TFPI は直接的あるいは間接的な Xa 因子およびトロンビンの阻害作用を発揮して体外循環におけるトロンビン産生を抑制し得るものと考えられる。体外循環においては、開胸操作に伴う組織因子発現以前の早期にヘパリンを静注して血中 TFPI 濃度を高めておくことにより、外因系凝固系路の活性化を主体とする凝固線溶系の異常亢進状態をより効果的に制御し得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 森住 誠, 平松祐司, 他. Early heparin administration increases plasma tissue factor pathway inhibitor and attenuates tissue factor

mediated thrombin generation during simulated cardiopulmonary bypass. Federation of American Societies for Experimental Biology 2011, April 13, 2011, Washington DC, USA.

- ② 平松祐司. Current research topics in pediatric cardiac surgery. Collaborative Seminar; University of Tsukuba and Hue College of Medicine and Pharmacy, Jan 26, 2011, Hue, Vietnam.
- ③ 後藤行延, 平松祐司, 他. A novel primate model to study bone-marrow-derived leukocyte kinetics induced by cardiopulmonary bypass. CHEST 2010, Oct 30-Nov 4, 2011, Vancouver, Canada.

〔図書〕(計 1 件)

- ① 平松祐司. 新生児・乳児早期の体外循環と無輸血体外循環. 体外循環と補助循環. 第 25 回日本人工臓器学会教育セミナーテキスト, 富澤康子編集, 日本人工臓器学会 p. 87-96 (総ページ数 150) 2009.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/cardiovascularsurg/index2.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平松 祐司 (HIRAMATSU YUJI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授

研究者番号：3 0 3 0 2 4 1 7

(2) 研究分担者

揚山 直英 (AGEYAMA NAOHIDE)

独立行政法人医薬基盤研究所・霊長類医科学センター・主任研究員

研究者番号：5 0 3 9 9 4 5 8

榊原 謙 (SAKAKIBARA YUZURU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：6 0 1 9 2 0 8 5

長谷川 雄一 (HASEGAWA YUICHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
准教授
研究者番号：00251059

徳永 千穂 (TOKUNAGA CHIHO)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師
研究者番号：30451701